

На правах рукописи

Мохсен Самими

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ
ПОЛИСАХАРИДОВ С БИОПРЕПАРАТАМИ

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Алимова Фарида Кашифовна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук
Уразов Наиль Гумерович
заведующий отделом культивирования и
идентификации вирусов Республиканского
центра по борьбе со СПИД и ИБ МЗ, г. Казань)

доктор ветеринарных наук, профессор
Алимов Азат Миргасимович
проректор по научной работе, зав. кафедрой
биологической и неорганической химии,
Казанской академии ветеринарной медицины
имени Н.Э. Баумана, г. Казань
доктор биологических наук, профессор,

Ведущая организация:

ГБОУВПО Казанский государственный
медицинский университет (ГБОУВПО
«Казанский ГМУ»), г. Казань

Защита диссертации состоится «30» Апреля 2015 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан

« » 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

 З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Природные полимеры являются важным объектом фундаментальных и прикладных исследований в биохимии и смежных областях науки и технологии. Среди них полисахариды – разнообразный класс биополимеров, выполняющих ряд важнейших биологических функций: структурную, регуляторную, защитную, а также функцию молекулярного распознавания. На основе полисахаридов предложены и продолжают разрабатываться биологически активные препараты, в частности, иммуномодуляторы (William H., 2014; Brianna O. et al., 2015), вакцины (Nafee N. et al., 2007; Tian J. et al., 2008; Li P. et al., 2013), антикоагулянты (Fan L. et al., 2011; Heike M.A. et al., 2015), сорбенты (Vijaya Y. et al., 2008; Nishad P. A. et al., 2014), выделяемые из бактерий и высших организмов.

Благодаря разнообразным физико-химическим свойствам, потенциальной биосовместимости и низкой себестоимости, полисахариды рассматриваются в качестве перспективных полимеров для создания тканеинженерных материалов и новых форм лекарственных препаратов. Активно исследуется возможность применения анионных полисахаридов на основе уроновых кислот, например, альгиновой и гиалуроновой кислот, гепарина, а также пектинов (Jang J. et al., 2014; Venkatesan J. et al., 2015) в качестве структурообразующих компонентов матриц для регенерации твердых и мягких тканей. Хитозан и нейтральные целлюлоза, декстран и их химические производные. Применение полисахаридов позволяет осуществлять клеточную регенерацию.

Те же самые полимеры используются в системе доставки капсул, которые могут быть получены методами микроинкапсуляции с использованием различных технологических приемов и гелеобразователей.

К настоящему времени разработаны системы на основе анионных и катионных полисахаридов для доставки БАВ, главным образом, макромолекулярных биопрепаратов. Актуальной задачей является разработка носителей, содержащих низкомолекулярные лекарства и обеспечивающих их контролируемую доставку в разные отделы желудочно-кишечного тракта. С другой стороны, актуальной проблемой является высокоэффективная доставка белков и нуклеиновых кислот. В частности, разработано большое количество подходов к доставке невирусных генных препаратов (плазмидная ДНК, малая интерферирующая РНК) с использованием полисахаридов и их модифицированных форм (Remaut K. et al., 2007; Jeong J. et al., 2007; Carrillo C. et al., 2014).

Подобные полисахариды, как правило, существенно уступают в эффективности трансфекции коммерческим трансфекционным агентам. Актуальной проблемой является создание более эффективных методов, основанных на принципах конструирования капсул, а также понимании межмолекулярных взаимодействий и возможности их модулирования.

Степень разработанности темы исследования

В последние десятилетия интенсивно разрабатываются методы инкапсуляции высокомолекулярных лекарственных средств, таких как белки и нуклеиновые кислоты, в полисахаридные носители (Martins S. et al., 2007; Kregiel D. et al., 2013; Tang Z. et al., 2013; Li P. et al., 2013), однако исследования по высвобождению низкомолекулярных терапевтических соединений немногочисленны из-за низкой эффективности инкапсуляции лекарственного средства (ЭИЛ) и способности взрывному высвобождению низкомолекулярных терапевтических средств. Низкая ЭИЛ альгинатных частиц обусловлена их пористостью, достаточной для потери инкапсулированного вещества - диффузией лекарственного средства из структуры полимера в раствор хлорида кальция (Martins S. et al., 2007). Для устранения этого недостатка альгинатные частицы усиливают, добавляя такие полимеры как хитозан, (Abruzzo A. et al., 2013) пектин, (Alvarez-Lorenzo C. et al., 2013) метилцеллюлоза, (Mujtaba A. et al., 2014) и декстран сульфат (Martins S. et al., 2007).

Форма и гомогенность получаемых частиц также сказываются на ЭИЛ и высвобождении вещества: чем ближе к сферической форма частиц и гомогенность частиц по размеру, тем больше ЭИЛ и тем медленнее происходит высвобождение лекарственных веществ. Существует ряд методов получения частиц для доставки лекарственных средств. Электрораспыление – это простой и надежный метод приготовления частиц (Fukui Y. et al., 2010; Zarrabi A. et al., 2012; Juntapram K. et al., 2012 Almeria B. et al., 2014).

Альгинат натрия является нетоксичным анионным полисахаридом (Lee K. Y. et al., 2012), который часто используется для приготовления нанокапсул (Lertsutthiwong P. et al., 2008; Krebs MD. et al., 2010; Tachaprutinun A. et al., 2013). Уникальная способность альгината к ионотропному гелеобразованию позволяет инкапсулировать макромолекулярные биоактивные агенты – белки (Kregiel D. et al., 2013; Tang Z. et al., 2013), и даже целые клетки (Gryshkov O. et al., 2014).

Терапевтические гены, будучи введены в виде свободной ДНК, подвергаются деградации в жидкостях макроорганизма, не имеют специфичности, демонстрируют низкую трансформирующую способность. В связи с этим существует потребность в разработке носителей генов на основе нетоксичных полисахаридов, защищающих ДНК и увеличивающих эффективность трансфекции (Suk JS. et al., 2014).

Хитозан также является природным полимером, который находит применение в биомедицине благодаря биоразложимости, биосовместимости, антимикробной активности и ранозаживляющему действию (Jayakumar R. et al., 2010). Будучи катионным полимером, хитозан электростатически взаимодействует с ДНК, при этом первичные аминогруппы хитозана связываются с анионным фосфатным остовом ДНК, что и приводит к образованию наночастиц из хитозана и ДНК (Li S. et al., 2000; Opanasopit P. et al., 2009). В этом комплексе ДНК защищена от атаки нуклеаз и показывает большую эффективность трансфекции (Jayakumar R. et al., 2010; Luo Y. et al., 2014; Rafiee A. et al., 2014).

Декстран сульфат является еще одним анионным полимером, который имеет значительное сродство к белкам (Valente J. F. A. et al., 2013), кроме того он часто

используется для усиления структуры частиц (Martins S. et al., 2009). Многочисленные исследования посвящены изучению композитных систем на основе биополимеров для создания системы доставки биологически активных веществ на основе комплексов хитозана и/или альгината (Moghaddam H. et al., 2008; Gazori T. et al., 2009; Hallaj-Nezhadi S. et al., 2011; Rafiee A. et al., 2014).

Цель и задачи исследований. Целью диссертационной работы является создание и исследование активности *in vitro* новых систем контролируемой доставки биологически активных препаратов на основе комплексов полисахаридов.

В соответствии с целью решались следующие **задачи**:

1- Разработка эффективных подходов для получения композиционных капсул на основе катионных и анионных полисахаридов с контролируемым размером и параметрами высвобождения БАВ.

2- Модельное исследование желудочно-кишечного высвобождения низкомолекулярных препаратов из pH-чувствительных капсул на основе альгиновой кислоты.

3- Получение и характеристика макромолекулярных комплексов на основе хитозана в качестве системы доставки плазмидной ДНК в клетки человека.

4- Сравнительное исследование цитотоксической и трансфекционной активности комплексов полисахаридов с плазмидной ДНК различного состава, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, в сравнении с коммерческими трансфекционными агентами.

Научная новизна работы

Научная новизна диссертационного исследования состоит в том, что:

Использование комбинации ионотропного гелеобразования и электрораспыления позволяет создавать частицы с большей емкостью для низкомолекулярных препаратов и лучшими характеристиками доставки в желудочно-кишечном тракте.

Системы доставки ДНК на основе комплекса хитозана и декстрана обеспечивают надежную защиту нуклеиновых кислот и эффективную трансфекцию в клетки.

Наночастицы, содержащие комплекс из хитозана, альгината и декстрана, не только не токсичны, но и усиливают пролиферацию клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы:

1- Разработан комбинированный метод получения pH-чувствительных капсул из альгиновой кислоты посредством электрораспыления/ионотропного гелеобразования для доставки низкомолекулярных препаратов в желудочно-кишечном тракте.

2- Создана эффективная система доставки плазмидной ДНК на основе хитозана и декстрана, характеризующая однородностью, высокой нагрузкой и отсутствием цитотоксичности.

Положения, выносимые на защиту:

1- Комбинированный метод получения pH-чувствительных капсул из альгиновой кислоты посредством электрораспыления/ионотропного гелеобразования для доставки низкомолекулярных препаратов в желудочно-кишечном тракте.

2- Эффективная система доставки плазмидной ДНК на основе хитозана, характеризующая однородностью, высокой нагрузкой и малой цитотоксичностью.

Степень достоверности результатов исследования

Все научные положения и выводы обоснованы с применением системного анализа поставленной темы исследования, современных методов научно-биологических исследований, полученные результаты подвергнуты математическому анализу. Все эксперименты проведены в нескольких повторностях, выполнены и анализированы на современных приборах, с помощью современного программного обеспечения. Результаты исследований и опубликованы в зарубежном и российском научных журналах после рецензирования манускриптов специалистами в данной области.

Апробация работы

Основные положения результаты диссертации представлены на следующих конференциях: международная научная интернет-конференция Казанского федерального университета «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (19-22 ноября 2012 г.); международная конференция Казанского федерального университета «биохимия - основа наук о жизни» (21-23 ноября 2013 г.) и международная конференция Московского государственного гуманитарного университета; «Шестая научная конференция иранских студентов в Российской Федерации» (19-22 ноября 2012 г.);

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования

Работа выполнена в соответствии с тематическим планом института фундаментальной медицины и биологии КФУ в рамках проекта «Биохимические, молекулярно-генетические и биоинформационные аспекты взаимодействия нано и биопрепаратов с живыми организмами» (НИР КФУ, девиз Бюджет 12-01).

Личное участие автора состоит в формулировке и постановке целей и задач исследований; анализе и переработке данных литературы; выборе методик экспериментов; проведении лабораторных экспериментов; обсуждении, анализе и обобщении полученных результатов, и формулировке выводов; непосредственной подготовке материалов для публикаций в международном журнале и в журналах,

рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ; участия в международных и Всероссийских конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, включает 25 рисунков и 5 таблиц. Библиография включает 377 зарубежных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Объекты исследований

Хитозан с низкой молекулярной массой ($M_w=50$ kDa, DD > 75%), натриевая соль декстран сульфата с молекулярной массой >500 kDa, альгинат натрия, 3-(4,5-диметилтиазол-2-)-2,5 – дифенил тетразолиум бромид (МТТ), пропранолол и хлорид кальция были произведены Sigma-Aldrich (США).

Штамм *Escherichia coli* Nova Blue (Novagen, США), содержащий вектор pEGFP-N2 (Invitrogene, США) выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США), содержащей 100 мкг/мл ампицилина (ПанЭко, РФ) при 37°C и интенсивной аэрации. Для приготовления всех трех типов наночастиц использовалась ДНК pEGFP-N2.

Трансфецирующий агент липофектамин - Lipofectamine™ 2000 был приобретен в компании Invitrogen Inc. (США). Для разведения наночастиц и липофектамина была использована среда DMEM (ПанЭко, РФ).

Линия эмбриональных клеток почек (НЕК293) была получена из Altogen (США). Клетки НЕК293 культивировали в свежей полноценной среде, которую готовили на основе DMEM с добавлением 10% об/об эмбриональной телячей сыворотки, 2mM L-глутамина, пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Life technologies Inc., Великобритания) при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 % в инкубаторе Esco CelCulture CO2 incubater (Scimetrics Inc., США).

Клетки выращивали до конфлюента, после чего обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Gibco, Великобритания) при 37°C в течение 5 минут (трипсинизация).

1.2. Методы исследований.

Электрораспыление/ионотропное гелеобразование: Альгинатные частицы получали с использованием метода ионотропного гелеобразования / электрораспыления. В данном методе высокая концентрация раствора альгината подается через сопло с помощью шприцевого насоса при определенной скорости потока. Сопло помещали в высокое напряжение постоянного тока, в то время как противоположный электрод диска был заземлен. Когда электрическое поле и гравитационные силы преобладали над поверхностным натяжением капель на кончике сопла, капли отделялись. Капли капали в контейнер из гелеобразующего агента, который содержит раствор хлорида кальция, из капель в процессе ионотропного гелеобразования образовывались шарики альгината кальция. Электрическое поле было создано с использованием источника высокого напряжения постоянного тока, где положительные и отрицательные полюса были подключены к соплу и заземляющему электроду, соответственно. Расстояние между соплом и заземляющим электродом изолировали двумя пластинами из полипропилена.

Коацерватный метод: Композитные наночастицы из хитозана и декстран сульфата, с инкапсулированной плазмидной ДНК были получены с использованием

процесса коацервации в соответствии с модифицированным методом (Martins S. et al., 2007; Tang Z. et al., 2013; Li P. et al., 2013). Статистический метод Тагучи (Taguchi et al., 2005) был использован для планирования экспериментов и реализован на программном обеспечении Minitab- 16. Для приготовления композитных наночастиц с инкапсулированной пДНК были выбраны две концентрации хитозана (0.01 и 0.02% в/об), три концентрации декстрансульфата (0, 0.001 и 0.002% в/об) и пДНК (50, 80 и 140 мкг / мл) с использованием программного обеспечения.

Динамическое рассеяния света: Оценку и определение гидродинамического диаметра (размера) наночастиц (наночастиц) проводили с использованием динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Вустершир, Великобритания). Измерения проводились при 25°C с использованием угла рассеяния 173°. Каждый образец был измерен три раза с использованием одноразовой кюветы. Индекс полидисперсности (ИП) определяли для каждого образца в качестве меры распределения частиц по размерам. Зета-потенциал был определен методом лазерной доплеровской скорости на (LDV) с помощью Zetasizer Nano ZS. Измерения проводились при 25°C в одноразовых капиллярах. Каждый образец был измерен три раза.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ): Морфология поверхности частиц из выбранных наночастиц была исследована с помощью сканирующей электронной микроскопии. Одну каплю выбранных наночастиц помещали на стекло и высушивали, а затем исследовали с помощью электронного микроскопа (СЭМ-Цейсс компании, Германия). Морфология поверхности шариков изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), модель: XL30 Philips (Нидерландах). Подготовленные шарики были установлены на металлических заглушках, а золотая пленка была покрыта под вакуумом с использованием распыления для нанесения покрытий (Bal-Тес компании, Швейцария).

Электрофорез в агарозном геле: Емкость частиц, состоящих из хитозана, хитозана / альгината, хитозана / альгината-декстрана сульфата и хитозана / декстрансульфата для инкапсуляции плазмидной ДНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Высвобождение пропранола из альгинатных комплексов in vitro: Высушенные гранулы были помещены в два различных модельных раствора, 100 мл HCl pH = 1,2 (2 ч / с перемешиванием 120 оборотов в минуту), а также в фосфатном буфере с pH = 6,8 (6 ч / с перемешиванием 120 оборотов в минуту) при 37 ° C. В определенные промежутки времени, аликвоты отбирали, а затем анализировали с помощью УФ-спектрофотометра количество высвобожденного из частиц пропранолол-HCl.

Определение инкапсулирующей активности частиц для плазмидной ДНК: Эффективность инкапсуляции (ЭИ) плазмидной ДНК была определена с использованием прямых и косвенных методов. В косвенном методе эффективность инкапсуляции ДНК определяли путем обнаружения и инкапсулированной в частицы и свободной ДНК.

Культивирование клеток: Клетки эмбриональной почки (HEK293) человека были получены из Altogen. Клетки HEK293 культивировали в свежей культуральной среде DMEM (с добавлением 10% об / об ФБС (фетальной бычьей сыворотки), 2 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллинового раствор (50U / мл) и стрептомицин (50 мкг / мл) при 37 ° C в увлажняемой атмосфере, содержащей 5% CO₂ (Еско CelCulture incubater CO₂; Scimetrics Inc., Хьюстон, США). Клетки выращивали до конфлюэнта, а затем обрабатывали раствором трипсина (0,05% трипсина и 0,05% ЭДТА) и инкубировали при 37 ° C в течение 5 минут.

Определение эффективности трансфекции: Клетки линии HEK293 были использованы для экспериментов по трансфекции. Для определения трансфекционной эффективности наночастиц, HEK293 клетки высевали в 24-луночные планшеты при плотности 5×10^4 клеток / лунку и культивировали в течение 24 часов в 500 мкл свежей культуральной среде DMEM (с добавлением 10% об / об ФБС (фетальной бычьей сыворотки), 2 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллина раствор (50U / мл) и стрептомицин (50 мкг / мл) при 37°C в увлажняемом атмосфере Fi изд содержащей 5% CO₂ (Esco incubater CelCulture CO₂; Scimetrics Inc., Хьюстон, США). Собранные клетки ресуспендировали в PBS и процент эффективности трансфекции был определен с помощью проточной цитометрии (easyCyte, Millipore, США).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Приготовление однородных сферических частиц с инкапсулированным веществом является первостепенной задачей при разработке систем доставки лекарственных средств. Применение растворов с низкой концентрацией альгината натрия ведет к образованию механически нестабильных частиц, которые быстро высвобождают инкапсулированное лекарственное вещество. В тоже время получение однородных прочных сферических частиц из альгината кальция невозможно с помощью обычных методов. В первой части исследований прочные сферические частицы альгината кальция с инкапсулированным пропранол-гидрохлоридом были получены из концентрированного раствора альгината натрия с использованием метода, который сочетает электрораспыление и ионотропное гелеобразование. Целью данного исследования было изучение взаимодействий альгината в процессе гелеобразования для увеличения инкапсуляции пропранол гидрохлорида и снижения начального взрывного высвобождения этого вещества при попадании частиц альгината кальция в окружающую среду. Для этого изучали влияние напряжения, размера сопла, скорости потока и концентрации альгината натрия на размер получаемых частиц и эффективности инкапсуляции лекарственного средства (ЭИЛ).

Согласно полученным результатам увеличение напряжения вело к снижению размеров частиц почти до минимального значения; напряжение, при котором был получен минимальный размер частиц был обозначен как критический и соответствовал 8 кВ. Увеличение напряжения при любой концентрации альгината натрия вело к снижению емкости частиц для пропранол-гидрохлорида. Это явление объясняется уменьшением размеров частиц и, следовательно, уменьшением отношения объема к поверхности, что способствует большей диффузии пропранола в процессе ионотропного гелеобразования.

Увеличение концентрации альгината натрия от 1% до 2% вело к увеличению размера частиц, дальнейшее увеличение концентрации раствора альгината натрия имело обратный эффект на размер получаемых частиц.

Увеличение концентрации раствора альгината натрия приводило к увеличению вязкости, плотности, электропроводимости и поверхностного натяжения. Усиление вязкости и поверхностного натяжения раствора приводило к увеличению размера образующихся частиц, тогда как увеличение электропроводности и плотности раствора способствовало формированию более мелких частиц. Увеличение концентрации альгината ведет к появлению больших сайтов связывания для ионов Ca^{2+} , что приводит к формированию более компактной мембраны геля, что препятствует диффузии лекарственного средства в процессе ионотропного гелеобразования.

Увеличение скорости потока вело к увеличению размера частиц и увеличению эффективности инкапсулирования пропранола. Увеличение эффективности инкапсуляции в данном случае также объясняется увеличением отношения объёма к поверхности и, следовательно, снижением уровня диффузии инкапсулированного вещества во время ионотропного гелеобразования. Следует отметить, что после

определенных значений, дальнейшее усиление потока приводило к снижению размеров частиц.

Увеличение размера сопел с 1 до 2 мм приводило к увеличению размеров получаемых частиц, тем не менее дальнейшее увеличение с 2 до 3 мм не оказывало значительного влияния на размер частиц. Использование сопла большего диаметра приводило к незначительному увеличению эффективности инкапсуляции лекарственного средства (данные не показаны).

Известно, что декстран усиливает матрицу (скелет) создаваемых частиц, тогда как хитозан формирует тонкий слой на поверхности частиц. Декстран сульфат был добавлен в желирующую среду в раствор альгината натрия и в раствор хитозана для увеличения ЭИЛ в приготавливаемых частицах.

В случае частиц, покрытых хитозаном, размер был увеличен с 3.7401 мм до 4.2763 мм для раствора альгината 2% и с 4.1023 мм до 4.4213 мм для раствора альгината 3%. Для частиц, усиленных декстраном, размер увеличился с 3.7401 мм до 4.3357 мм для раствора альгината 2% и с 4.1023 до 4.6172 для раствора альгината 3%.

При добавлении декстран сульфата и нанесения слоя хитозана ЭИЛ увеличилась. Более того, ЭИЛ у 3% вариантов альгината, альгината, покрытого хитозаном и альгината, покрытого хитозаном, и усиленного декстраном (1%) была выше, чем у тех же вариантов с 2% альгинатом. Все это показывает, что усиление матрицы с увеличением концентрации альгината. Результаты показывают, что частицы с хитозановым покрытием и/или усиленные декстраном инкапсулировали больше пропранол-гидрохлорида. Фотографии высушенных частиц и их поверхности, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) приведены на рисунке 6. Все частицы имеют удовлетворительную сферическую форму и относительно ровную поверхность, однако имеющую морщины. В предыдущих исследованиях (Martins S. et al., 2007; Pasparakis G. et al., 2006) изменение формы высушенных частиц их сокращение наблюдали у частиц приготовленных из растворов с низкой концентрацией альгината. В наших исследованиях частицы не теряли своей сферической формы после высушивания. Детальное изучение структуры поверхности частиц показало, что трещины развиваются из-за сокращения полимера в процессе воздушного высушивания.

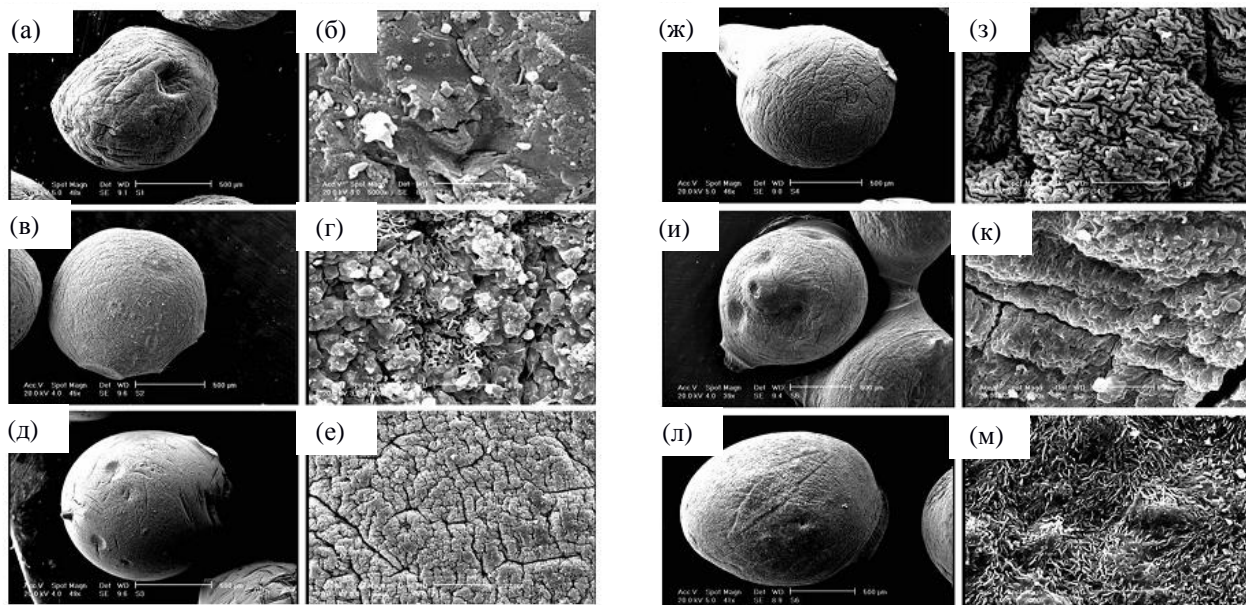


Рисунок 2. Микрофотографии полученные с помощью СЭМ следующих образцов: (слева) и морфологии их поверхности (справа); (а и б) Альгинат, 2%; (в и г) Альгинат, 2%- Хитозан, 0.5%; (д и е) альгинат, 3% ; (ж и з) альгинат, 3% -хитозан, 0.5%; (и и к) альгинт, 2%- хитозан, 0.5% декстран сульфат1%; (л и м) альгинат, 3%-хитозан, 0.5% декстран сульфат, 1%.

Набухание частиц в СЖР и СКР

Набухание альгината образец С, набухание частиц покрытых хитозаном – образец D, а также покрытые хитозаном частицы и состоящие из альгината и декстрана образец – F показаны на Рисунке 2. Как видно из рисунка, все частицы подвержены набуханию в СКР при $pH=6.8$, набухание намного скромнее в СЖР $pH=1.2$. Набухание альгината в СЖР происходит за счет гидратации гидрофильных групп. Альгинатные частицы покрытые хитозаном демонстрируют большее набухание в СЖР, поскольку в этом растворе происходит и гидратация и протонизация аминогрупп хитозана.

Последнее явление создает выталкивающую силу и большее набухание альгинатных частиц покрытых хитозаном. Частицы, состоящие их альгината и декстран сульфата, и покрытые хитозаном показывают наибольшее набухание по сравнению с другими частицами. Такая же тенденция отмечается для СКР, с тем отличием, что набухание в этом растворе происходит значительно интенсивнее, чем в СЖР, что демонстрирует избирательность набухания частиц при разных значения pH .

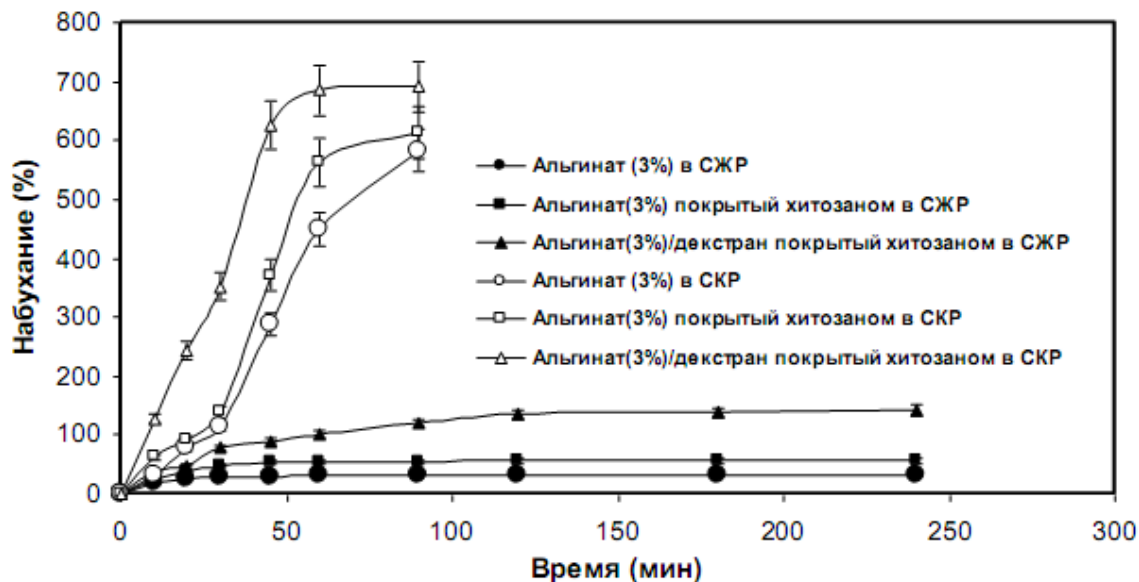


Рисунок 2. Набухание частиц состава: альгинат, альгинат, покрытый хитозаном, альгинат/декстран в СКР и СЖЖ.

Высвобождение пропранол гидрохлорида

Высвобождение пропранол гидрохлорида исследовали в двух растворах СЖР и СКР со значениями pH соответственно 1.5 и 6.8. Профиль высвобождения пропранола показан на Рисунках 8 и 9. Взрывное высвобождение наблюдалось в течение 15 минут в обоих растворах и, очевидно, зависело от стабильности матрицы частиц и метода высушивания, поскольку высушивание на воздухе перемещало существенные количества пропранола на поверхность частицы. Пропранол является низкомолекулярным лекарственным средством, поэтому его высвобождение мало зависит от набухания частицы. Тем не менее, на Рисунках 3 и 4, что покрытые хитозаном или усиленные декстраном частицы имеют менее выраженное первичное взрывное освобождение лекарственного вещества.

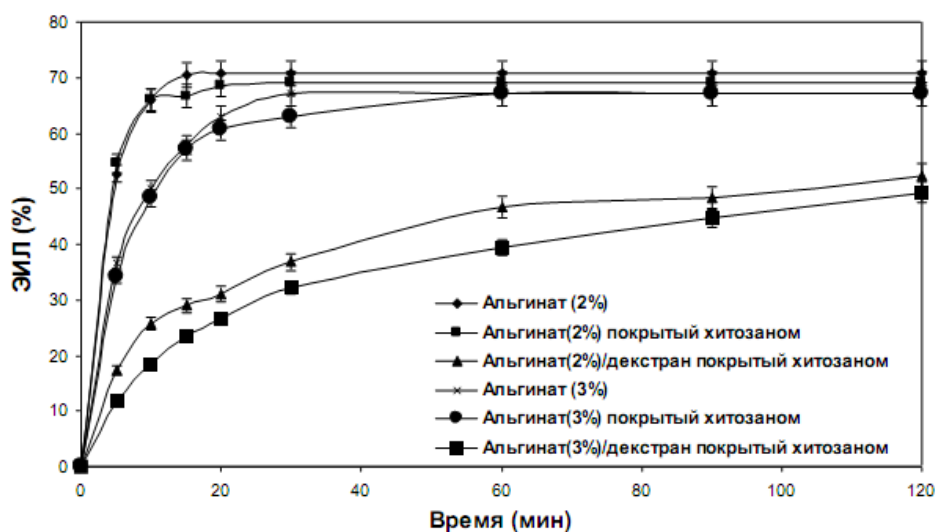


Рисунок 3. Высвобождение пропранола в СЖР (HCl, pH=1.5) из частиц.

Однако, высвобождение пропранола у покрытых хитозаном частиц и не покрытых отличалось незначительно, между тем как введение декстрана в состав частиц частично контролировало высвобождение лекарственного средства и снижало его взрывное высвобождение в первое время.

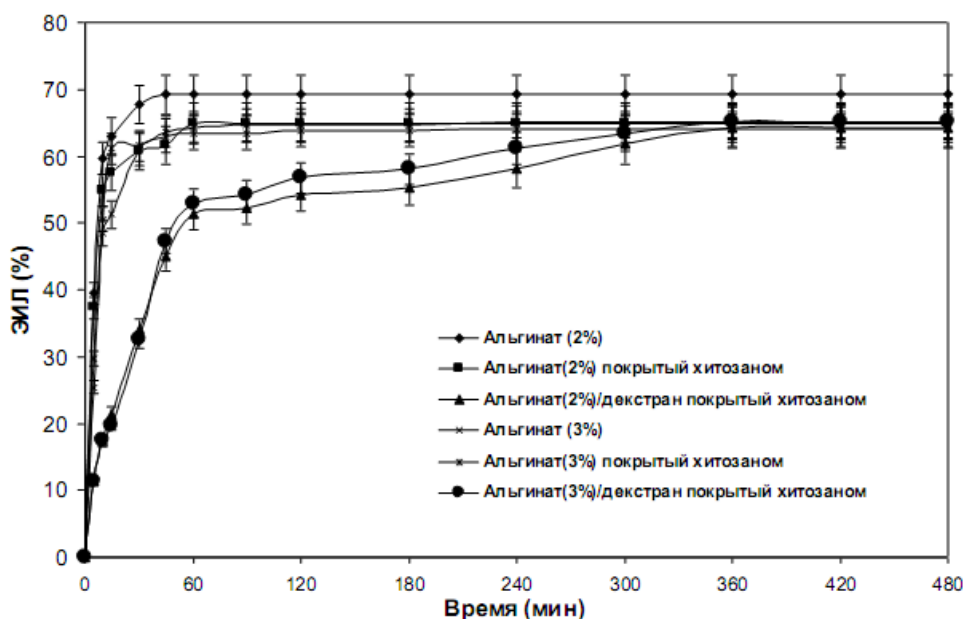


Рисунок 4. Высвобождение пропранола в СКР (PBS, pH=6.8) из частиц.

Перспектива использования генной терапии в лечении врожденных и приобретенных заболеваний значительно продвинула разработку средств доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени макроорганизма (Suk JS. et al., 2014). Терапевтические гены, введенные в виде свободной молекулы ДНК, подвергаются деградации в жидкостях макроорганизма, не обладают избирательностью и демонстрируют низкую трансформационную способность. Эти недостатки стимулируют разработку носителей генов на основе нетоксичных биополимерных наночастиц, защищающих ДНК и увеличивающих эффективность трансфекции (Suk JS. et al., 2014).

Следующими этапами нашего исследования являлись характеристика наночастиц, инкапсулированных пДНК, определение эффективности инкапсуляции ДНК, изучение стабильности комплексов и определение защитных свойств наночастиц по отношению к инкапсулированной ДНК. По нашим сведениям это первое сообщение о наночастицах состава из хитозан/декстран сульфат, хитозан/альгинат/декстран сульфат, с инкапсулированной ДНК.

Изучение наночастиц на основе хитозана с инкапсулированной ДНК

Частицы, состоящие из хитозана и декстран сульфата, с инкапсулированной ДНК, образовывались за счет реакции коацервации между позитивно заряженными ионами полиэлектролитных полимеров: декстран сульфата, ДНК (оба полимера несут отрицательный заряд) и хитозана (положительный заряд). Реакция коацервации происходит за счет электростатического взаимодействия протонизированной аминогруппой ($-NH_3^+$) хитозана и сульфатными группами декстран сульфата (Chen

Y. et al., 2007). Кроме того, протонизированные аминогруппы хитозана взаимодействуют с фосфатными остатками ДНК. Электростатическое взаимодействие между ДНК и хитозаном приводит к разделению фаз, когда эти два противоположно заряженных биополимера смешиваются в водном растворе появляется фаза, богатая полимерами, и фаза, обедненная полимерами. Фаза сепарации и коацервации были увеличены за счет добавления сульфата натрия, который служит агентом коацервации (Leong K.W. et al., 1998).

Размер частиц, индекс полидисперсности, зета-потенциал наночастиц на основе хитозана

Многие характеристики могут влиять на трансфекционную эффективность биополимерных наночастиц: средний размер частиц, вариабельность размеров частиц, ИП, зета потенциал и эффективность инкапсуляции. Влияние разных параметров было оценено в 18 различных экспериментах, которые были рассчитаны с помощью метода Тагучи в программном обеспечении Minitab-16 (Таблица 1). Размер – это один из параметров, влияющих на эффективность трансфекции наночастиц. На Рисунке 5 показана вариабельность размеров наночастиц. Концентрационные эффекты хитозана, декстран сульфата и пДНК были исследованы. Этот анализ позволил определить оптимальные условия для приготовления частиц из хитозана и декстран сульфата с инкапсулированной ДНК. Минимальный размер частиц был также определен. Размер наночастиц увеличивался с уменьшением концентрации хитозана, тогда как увеличение пДНК с 80 до 140 мкг/мл незначительно сказывалось на размере частиц. Наночастицы, содержащие 0.001 % декстран сульфата, были больше чем наночастицы, состоящие исключительно из хитозана. Однако увеличение количества декстрана до 0.002 % приводило к формированию меньших по размеру частиц. Согласно Рисунку 10 средний гидродинамический диаметр для частиц из хитозана и декстран сульфата с инкапсулированной ДНК изменялся в пределах от 129.1 нм до 674.1 нм. Наименьший средний диаметр был получен в эксперименте E₆, где было наибольшее содержание декстран сульфата и наименьшее содержание хитозана.

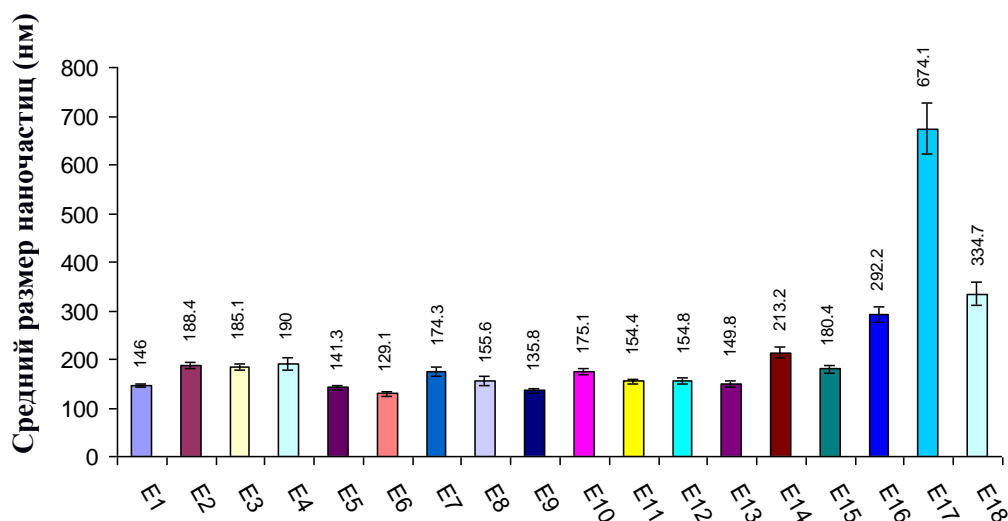


Рисунок 5. Средний размер полученных наночастиц. Образцы (E₁ – E₁₈)

Влияние концентраций биополимеров на Индекс Полидисперсности (ИП)

Вариабельность размеров частиц оценивалась как ИП, который является мерой гомогенности системы и изменяется от 0 до 1. Гомогенными считаются системы со значениями ИП, близкими к 0; при значениях ИП выше 0.3 система считается гетерогенной (Zhang L. et al., 2007). Все образцы кроме E₁₇ имели значения ИП ниже 0.3 (Таблица 4).

ИП наночастиц увеличивался с увеличением концентрации хитозана, то есть увеличение количества хитозана приводило к формированию более разнородных по размеру частиц. Изменения в концентрации ДНК с 50 до 80 мкг/мл сказывались на ИП незначительно; дальнейшее увеличение концентрации ДНК до 140 мкг/мл приводило к увеличению гетерогенности размеров наночастиц. При добавлении декстран сульфата в низких концентрациях образовывались гетерогенные частицы, однако при увеличении концентрации декстрана от 0.001 до 0.002 вес/объём, наблюдалось снижение ИП. Данные результаты показывают, что концентрации полимеров оказывают значительное влияние на однородность получаемых частиц.

Результаты анализа показывают, что увеличение концентрации ДНК в промежутке с 80 до 140 мкг/мл имеет более значительное влияние на ИП, чем изменения концентрации двух других полимеров.

Влияние концентраций биополимеров на зета-потенциал

Зета потенциал наночастиц уменьшался с уменьшением концентрации декстран сульфата и пДНК, а также с увеличением концентрации хитозана.

Зета потенциал наночастиц изменялся в пределах от -11.5 до 23.3 (при pH 5.5). Наименьший зета потенциал наблюдался в образце E₉, с наименьшей концентрацией хитозана. Самый высокий зета потенциал был у образцов E₁₀ и E₁₂ с наименьшей концентрацией пДНК и наибольшей концентрацией хитозана. Образцы с низким зета потенциалом имели низкие концентрации хитозана и высокие – декстран сульфата. Негативный заряд на поверхности или низкий зета потенциал наночастиц (образцы E₃, E₅, E₆ – E₉) указывает на избыток пДНК и/или декстран сульфата в смеси, а также на то, что связывание ДНК и декстран сульфата с хитозаном было неполным.

Заряд частиц E₁, E₂, E₄ и всех приготовленных наночастиц с высокой концентрацией хитозана (E₁₀ – E₁₈) был достаточно позитивным, для того чтобы частицы не стали отрицательно заряженными. Более того, появление свободных аминок групп на поверхности ответственно за положительный зета потенциал частиц (Hallaj-Nezhadi S. et al., 2011).

Эффективность инкапсуляции

Количество пДНК, инкапсулированное в частицы определялось как разница между количеством внесённой и свободной ДНК в растворе. За эффективность инкапсуляции (%) принимали отношение количества инкапсулированной ДНК к количеству внесённой ДНК.

Эффективность инкапсуляции композитных наночастиц значительно увеличивалась в присутствии декстран сульфата, однако этот эффект пропадал при дальнейшем увеличении декстран сульфата от 0.001 до 0.002%. Эффективность инкапсуляции также росла при увеличении концентрации хитозана и снижении количества пДНК.

Увеличение эффективности инкапсуляции пДНК в присутствии декстран сульфата можно объяснить общим усилением структуры наночастицы по сравнению с частицами где использован только хитозан (Khorram M. et al., 2015). Эффективность инкапсуляции пДНК у частиц, состоящих из декстрана и хитозана варьировала в пределах от 47.31 до 98.32. Как сообщалось раньше, связь между хитозаном и ДНК (Li XW et al., 2003), и связь между хитозаном и декстран сульфатом (Chen Y. et al., 2007) была очень стабильной, что приводило к сильному ионному взаимодействию в парах пДНК – хитозан и декстран сульфат – хитозан. Кроме того, следует учитывать, что гидрофобные взаимодействия и водородные связи, которые могут возникать между ДНК и сахарами, также могут вносить вклад в стабилизацию структуры композитной наночастицы. Эти результаты поддерживают идею множественного взаимодействия между биополимерами: хитозаном, декстран сульфатом и ДНК.

Наименьшая эффективность инкапсуляции наблюдалась в образце E₉, где содержалось наименьшее количество хитозана, самую большую эффективность инкапсуляции показал образец E₁₂, в котором были самые высокие концентрации хитозана и декстран сульфата и самые низкие концентрации пДНК.

Изучение морфологии наночастиц

Исследование с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показало, что инкапсулированные ДНК наночастицы, содержащие хитозан и декстран сульфат имеют сферическую форму. Также была обнаружена агрегация частиц, согласно результатам DLS. Размер частиц уменьшался в процессе высушивания, например: частицы образца E₁₄ согласно данным СЭМ имели размер около 100 нм, в то время как измерения DLS показывали размер частиц 213 нм. Последний анализ производится в водном растворе, где наночастицы имеют тенденцию к набуханию, тогда как в случае СЭМ образцы высушивают. Различия в условиях подготовки образцов, по-видимому, и являются причиной разных показаний этих двух методов (Dickerson R. E. et al., 1982). Известно, что для поддержания спиральной структуры ДНК также необходима вода, без которой структура схлопывается (Guo R. et al., 2013). Кроме того, в частицах, приготовленных без добавления декстран сульфата наблюдались тороидальные и палочковидные структуры (Рисунок 5). Такие изменения при высушивании, очевидно, свидетельствуют о стабилизирующей роли декстран сульфата.

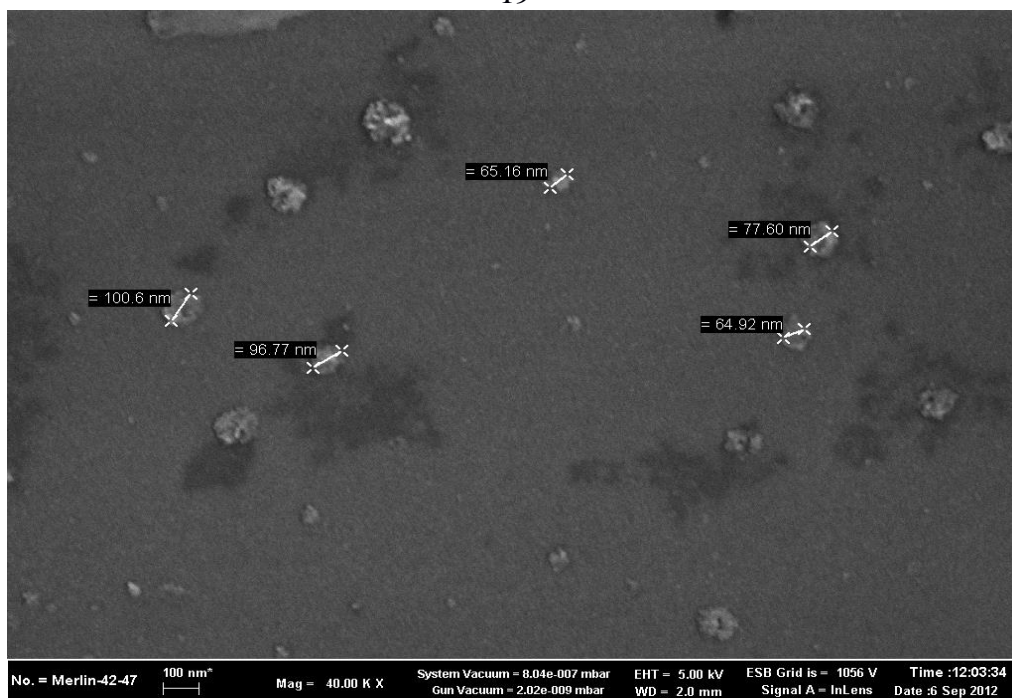


Рисунок 5. Результаты изучения наночастиц образца E_{14} с сканирующего электронного микроскопа

Связывание ДНК

Способность хитозана и декстрана образовывать комплексы с ДНК и способность сформированных наночастиц удерживать инкапсулированную ДНК изучалась с помощью электрофореза в агарозном геле. За исключением образцов E_7 , E_8 и E_9 ДНК, заключенная в наночастицы, теряла электрофоретическую подвижность и оставалась в лунках, связанная с наночастицами. Эти данные хорошо согласуются с эффективностью инкапсуляции, которая для образцов E_7 , E_8 и E_9 была низкой (Таблица 5), то есть в препаратах оставалась несвязанная пДНК. Об этом же свидетельствует соотношение азота и фосфора в данных частицах, которое равняется 1.4, что также говорит о избытке ДНК, которую можно видеть мигрирующей в агарозном геле.

На Рисунке 6 приведены результаты обработки пДНК и наночастиц образца E_{14} эндонуклеазой *BamH I*. Как и в случае частиц с альгинатом высвобождение ДНК не наблюдалось. Более того, обработка наночастиц хитазаназой, которая разрушает наночастицы с высвобождением ДНК, показала, что ДНК в наночастицах полностью защищена от гидролиза *BamH I*. Также как и в предыдущих экспериментах (Рисунок 12), электрофореграммы плазмидной ДНК, высвобождающейся из наночастиц, обработанных этой эндонуклеазой, и электрофореграммы ДНК из необработанных частиц, были идентичны (Рисунок 6).

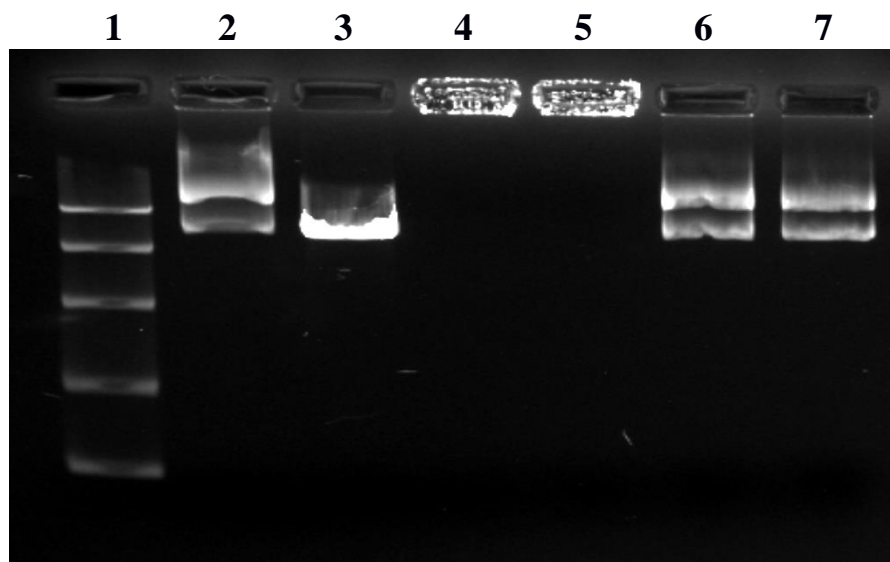


Рисунок 6. Анализ электрофоретической подвижности свободной и инкапсулированной плазмидной ДНК (pEGFP-N2) из образца E14. Дорожка 1 Маркеры молекулярной массы ДНК (HighRange, Thermo, США); дорожка 2 свободная пДРК (pEGFP-N2); дорожка 3: свободная пДРК (pEGFP-N2) обработанные BamH I; lane 4: наночастицы образца E14; дорожка 5: наночастицы образца E14, обработанные BamH I; дорожка 6: наночастицы образца E14, обработанные и хитозаназой; дорожка 7: наночастицы образца E14, обработанные, последовательно, BamH I и хитозаназой.

Тестирование цитотоксичности наночастиц

Цитотоксичность наночастиц исследовали с помощью МТТ теста в культуре клеток НЕК29. Свободная плазмидная ДНК и комплекс липофектамин/ДНК использовались как негативный и позитивный контроли цитотоксичности, соответственно. Наночастицы демонстрировали отсутствие какой-либо цитотоксичности, даже в концентрациях в пять раз превышающих количества, использованные для трансфекции (Рисунок 7 и 8). Наночастицы состава хитозан/альгинат/декстран сульфат оказывали стимулирующий эффект на пролиферацию клеток. При этом частицы состава хитозан-декстран сульфат (с E1 до E18) оказывали больший стимулирующий эффект на пролиферацию, чем наночастицы, содержащие альгинат. Жизнеспособность клеток, обработанных наночастицами хитозан-декстран сульфат достигала 160%, в то время как, жизнеспособность клеток после обработки наночастицами, содержащими альгинат составляла только 130% по сравнению с эффектом свободной плазмидной ДНК. Средняя жизнеспособность клеток после обработки липофектамином составляла 60%. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности у наночастиц, приготовленных на основе хитозана, альгината и декстран сульфата и возможности их использования в качестве векторов – носителей ДНК *in vivo*.

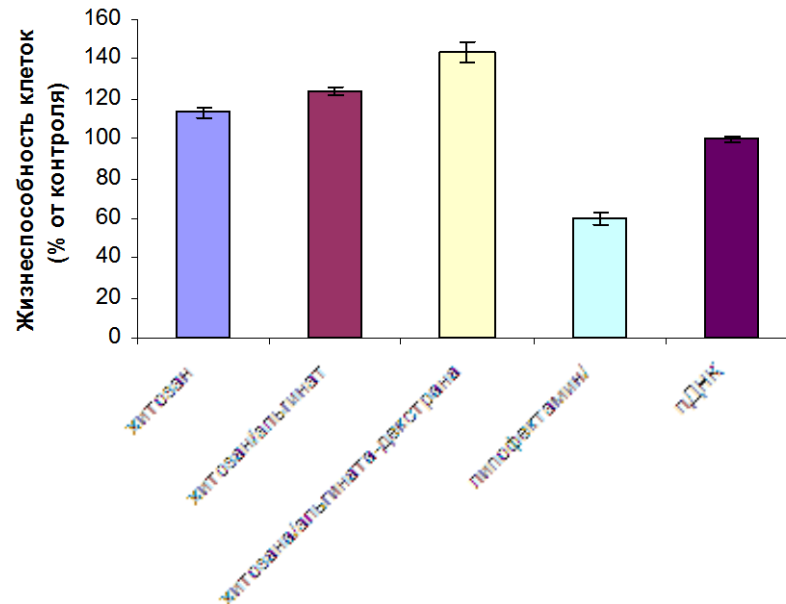


Рисунок 7. Средние значения жизнеспособности (\pm STD; $n=6$) клеток линии НЕК293 после инкубации со свободной пДНК, комплексом липофектамин/пДНК, наночастицами, состоящими из хитозана, хитозана/альгината, хитозана/декстран сульфата и хитозана/альгината/декстран сульфата.

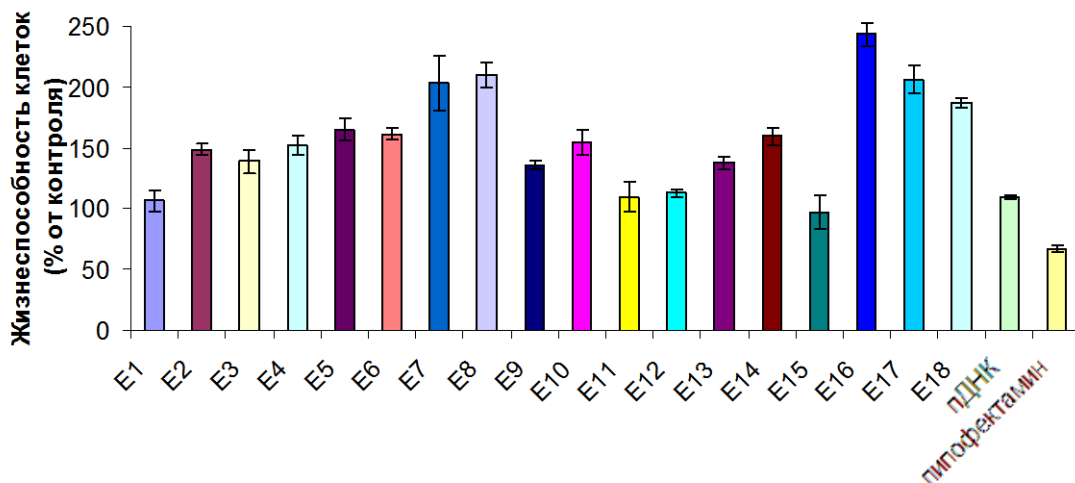


Рисунок 8. Средние значения жизнеспособности (\pm STD; $n=6$) клеток линии НЕК293 после инкубации со свободной пДНК, комплексом липофектамин/пДНК, наночастицами, состоящими из хитозана/декстран сульфата (образцы E1 - E18).

Исследование трансфекции *in-vitro*

Для определения эффективности наночастиц, состоящих из хитозана, хитозана/альгината, хитозана/декстран сульфата и хитозана/альгината/декстран сульфата, в трансфекции были использованы клетки линии НЕК 293 и плазмидный вектор pEGFP-N2, инкапсулированный в данные частицы. pEGFP-N2 содержит ген, кодирующий зеленый флюоресцирующий белок (GFP), поэтому трансфецированные этим вектором клетки флюоресцируют при облучении ультрафиолетом, в отличие от нетрансфецированных клеток. В качестве положительного контроля трансфекции использовался липофектамин. Рисунки 9 и 10 демонстрируют результаты

трансфекции и экспрессии GFP в клетках линии НЕК 293 при исследовании образцов с помощью люоресцентного микроскопа.

Анализ результатов с помощью проточной флуориметрии показал, что в результате трансфекции 55.39%, 44.16%, 38.49%, 35.04% и 12.16% клеток экспрессировали GFP когда использовали липофектамин, наночастицы, состоящие из хитозана/декстран сульфата (E14), хитозана/альгината/декстран сульфата, хитозана и альгината и хитозана (E13), соответственно. Трансфекционная эффективность наночастиц в образцах E1 - E18 показана на Рисунке 11.

Эти результаты показывают, что наночастицы, состоящие из хитозана/альгината/декстран сульфата, более эффективны в трансфекции, чем частицы, состоящие из одного хитозана. Возможным объяснением большей трансфекционной эффективности наночастиц, содержащих, кроме хитозана, еще и альгинат, является способность альгината увеличивать эндосомальное высвобождение ДНК за счет разрушения альгината, следует также учитывать ограниченную способность хитозана контролировать высвобождение ДНК из-за её гидрофильной природы (Ishii T. et al., 2001; George M. et al., 2006).

Большую трансфекционную эффективность хитозана в смеси с декстраном можно объяснить большим набуханием композитных частиц, что ведет к более эффективному высвобождению плазмидной ДНК в клетках (Khorram M. et al., 2015; Sonawane ND. et al., 2003).

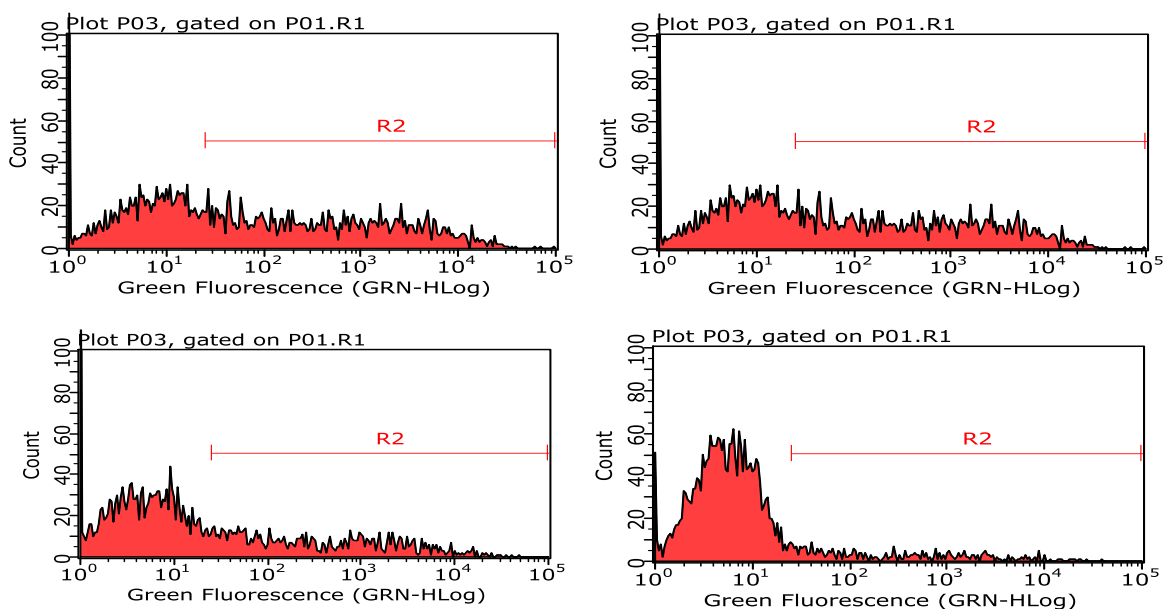


Рисунок 9. Анализ трансфецированных клеток с помощью проточной цитометрии (а): Липофектамин, (б): наночастицы состоящие из хитозана/декстран сульфата (E14), (в): хитозана/альгината-декстрана и (д): хитозана (E13) после 48 часов инкубации.

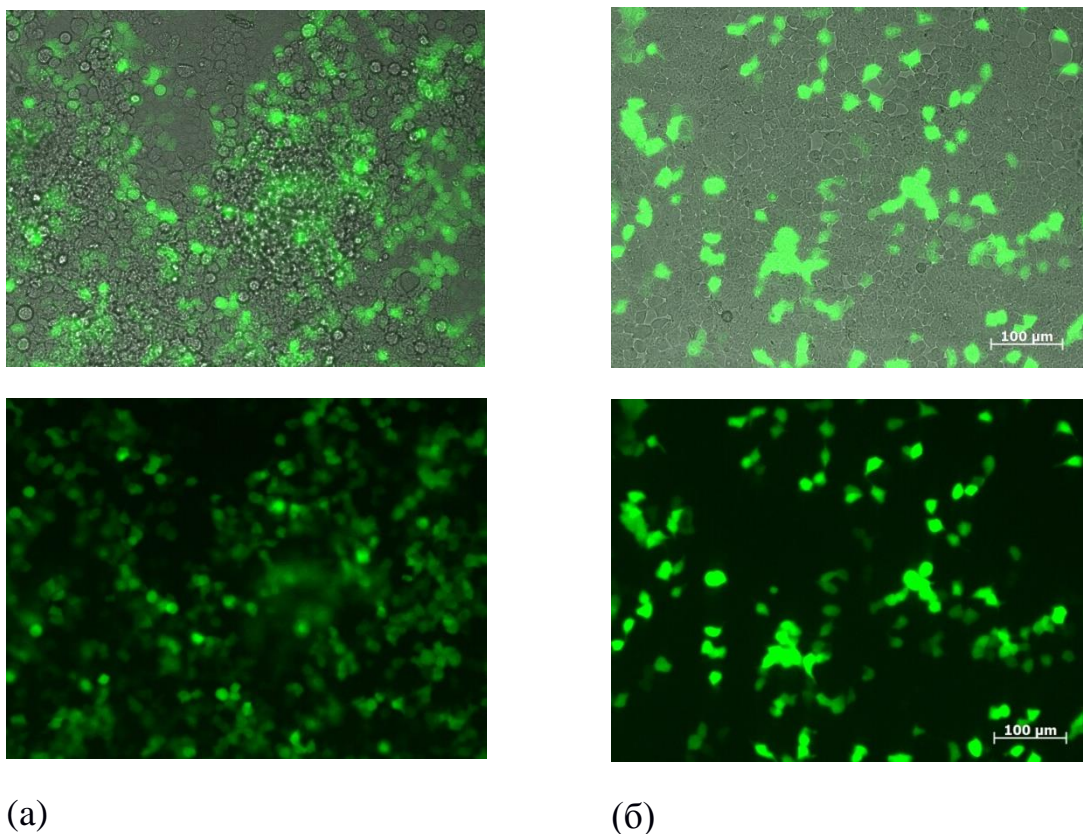


Рисунок 10. Экспрессия в клетках линии НЕК 298 трансфицированных (а): Липофектамином и (б): наночастицами, состоящими из хитозана/альгината/декстран сульфата после 48 часов инкубации.

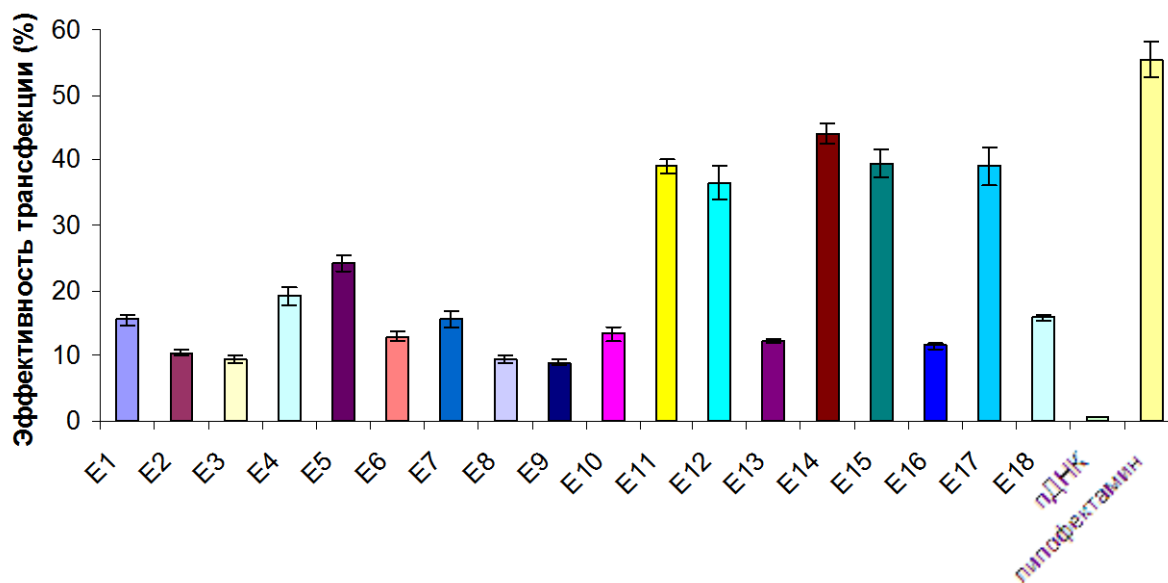


Рисунок 11. Эффективность трансфекции с помощью наночастиц, состоящих из хитозана/декстран сульфата, инкапсулированных плазмидной ДНК (образцы E1- E18, Таблица 5), свободной пДНК и комплекса липофектамин/ пДНК.

ВЫВОДЫ

1- Увеличение концентрации альгината, и усиления матрицы частицы при добавлении декстран сульфата на 70% увеличивает эффективность инкапсуляции пропранол гидрохлорида и снижает скорость высвобождения этого лекарственного вещества в синтетических средах, имитирующих желудочный сок и кишечную жидкость, тогда как процесс набухания частиц не влияет на высвобождение этого низкомолекулярного соединения.

2- Частицы инкапсулированной ДНК, состоящие из хитозана, хитозана и декстран сульфата, хитозана/альгината и декстран сульфата могут быть приготовлены методом ионотропного гелеобразования, электрораспыления и комплексной коацервации; наибольшую эффективность инкапсуляции ДНК показали частицы, состоящие из хитозана и декстран сульфата, приготовленные наименее трудоёмким способом – комплексной коацервации.

3- Инкапсулированные ДНК наночастицы, приготовленные методом комплексной коацервации, состоящие из хитозана и декстрана, показали наибольшую частоту трансфекции, кроме того, данные частицы показали наибольший положительный эффект на пролиферацию клеток, что позволяет предложить их в качестве основы для разработки средств доставки ДНК *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Khorram M. Electrospray Preparation of Propranolol-Loaded Alginate Beads: Effect of Matrix Reinforcement on Loading and Release Profile / M. Khorram, **M. Samimi**, A. Samimi, H. Moghaddam // J. Appl. Polym. Sci. 2014 - DOI: 10.1002/APP.41334
2. **Самими М.** Характеристика и трансфекционная эффективность ДНК-содержащих биокomпозитных наночастиц / М. Самими, Ф.К. Алимова, Б. Абтахи, Ш.З. Валидов // Современные проблемы науки и образования. 2015 –Т. 60, № 4 – С. 23-30. (Список ВАК, РИНЦ– 0,379)

II. Тезисы докладов региональных и международных конференций:

3. **Samimi M.** Preparation of low molecular drug loaded-Alginate/Chitosan-Coated Beads / M. Samimi, F.K. Alimova// Book of abstracts of the 3rd international online conference: biochemistry and bionanotechnology, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, Russia, 19-22 November, 2012– P. 344-345.
4. **Samimi M.** preparation of alginate/chitosan beads loaded with propranol-HCl / M. Samimi // Book of abstracts of the 6nd Scientific Conferences of Iranian Students in Russian Federation, Russian State University for the Humanities, Moscow, Russia, 2-3 March, 2013 – P. 344-345.
5. **Samimi M.** Preparation of DNA-loaded alginate-chitosan composite nanoparticles. / M. Samimi, F.K. Alimova, R.A. Kurbanov, O.V. Bondar // Book of abstracts of the international conference: biochemistry base on life science, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, Russia, 21-23 November, 2013– P. 23-24.
6. **Samimi M.** Preparation of pDNA-loaded chitosan/dextran sulfate composite nanoparticles / M. Samimi, F.K. Alimova, A.N. Ibragimov, Y.N. Osin, V.V. Vorobev // Book of abstracts of the international conference: biochemistry base on life science, Kazan (Volga region) federal university, Kazan, Russia, 21-23 November, 2013– P. 25-26.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. проф. **Алимовой Ф.К.** за внимательное отношение к работе; PhD **Валидову Ш.З.** за всестороннюю помощь в подготовке диссертационной работы. Благодарность выражается всем преподавателям, сотрудникам, аспирантам и студентам кафедры биохимии и биотехнологии КФУ за доброе отношение и посильную помощь.

Просьба посылать отзывы на автореферат по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне. Факс 8(843)238-76-01, E-mail: m.samimi@hotmail.com, Тел: +79274056443.